تأثير تنشيط الحيامن وإضافة السائل الحويصلي المعامل للأغنام في تحسين بعض صفات السائل المنوي المجمد للكباش العواسية

علي عبد الله زعيري السعدون[1] حازم كسار جاسر الصعب[2] اقبال عوض كاطع[1]

[1]كلية الزراعة / قسم الثروة الحيوانية / جامعة المثنى / جمهورية العراق

[2]كلية الزراعة / قسم الثروة الحيوانية/ جامعة بغداد / جمهورية العراق

المستخلص:

أجريت هذه الدراسة في مختبر الدراسات العليا العائد إلى قسم الثروة الحيوانية / كلية الزراعة / جامعة المثنى في صيف العام 2015 ، استخدمت فيها قصبات سائل منوي مجمد لكباش عواسي ، تمت إذابة مجموعة من القصبات وتم إجراء التقييم الأولي للسائل المنوي بعد الإذابة ، بعد ذلك تم تقسيم السائل المنوي المذاب على قسمين رئيسيين ، وكل قسم رئيسي تم توزيعه على أربعة أنابيب اختبار من نوع ابندروف. انابيب القسم الأول تم إضافة السائل الحويصلي الخاص بالأغنام لها (بعد استخلاصه وإجراء عملية التعطيل عليه وثم إضافة المضادات الحيوية له) وبالتراكيز التالية (0 ،5، 10 ،15%) وتم تسجيل قراءات الحركة الفردية والحركة التقدمية للحيامن فيه لكل تركيز على حدة ولعدة مرات لغرض معرفة تأثير السائل الحويصلي (بدون تنشيط) في تحسين الصفات المدروسة ، أما أنابيب القسم الثاني فقد تم إجراء عملية التنشيط لها بطريقة السباحة نحو الأعلى باستخدام السائل الحويصلي المعطل والمعامل بالمضادات الحيوية وبنفس التراكيز المذكورة في القسم الاول ، وبعد التنشيط وضعت العينات في الحاضنة بدرجة 37°م، وبعد 45 دقيقة تم إجراء فحوصات الحركة الفردية والحركة التقدمية للحيامن لكل تركيز على حدة ولعدة مرات لغرض معرفة تأثير التنشيط باستخدام تراكيز مختلفة من السائل الحويصلي في تحسين الصفات المدروسة .أظهرت النتائج تأثر الحركة الفردية والحركة التقدمية للحيامن المجمدة معنويا($P<0.05$) عند تنشيطها في وسط زرعي حاوي على تراكيز واطئة (0% و 5%) من السائل الحويصلي فيما كان التأثير عالي المعنوية($P<0.01$) عند استخدام التراكيز الأعلى (10 ،15%) من السائل الحويصلي ويمكن اعتبار هذه النتائج كمؤشرات ايجابية لإمكانية تحسين الصفات الفيزيائية السائل المنوي المجمد للكباش العواسي عن طريق تطبيق التنشيط (السباحة نحو الاعلى) باستخدام تراكيز مختلفة (10 ،15%) من السائل الحويصلي للأغنام قبل إجراء التلقيح الاصطناعي .

الكلمات المفتاحية: السائل الحويصلي ، السائل المنوي ، الكباش العواسية

المقدمة :

يمكن أن يساهم التلقيح الاصطناعي في الأغنام بشكل كبير في نشر التراكيب الوراثية المتميزة على نطاق واسع عن طريق زيادة عدد النسل المنتج من الكبش المتميز وراثيا في السنة الواحدة بسبب امتلاك الكباش القابلية على إنتاج أعداد كافية من الحيامن لتلقيح آلاف النعاج في موسم واحد (6).

تعد عملية حفظ السائل المنوي بالتجميد العميق إحدى العوامل المحددة لنشر تقانة التلقيح الاصطناعي في الأغنام لما تتميز به حيامن الكباش من حساسية عالية لدرجات الحرارة الواطئة (11) .تعود حساسية حيامن الكباش لدرجات الحرارة الواطئة الى حصول بعض التغيرات التركيبية والوظيفية في خلية الحيمن ناتجة عن صدمة البرودة تتضمن تأثر الاكروسوم (9)، الميتوكوندريا (17) والغشاء البلازمي للحيمن (12) .

يؤدي الغشاء البلازمي وغشاء الاكروسوم دورا مهما في حيوية الحيامن بعد التجميد والاذابة ، ويمكن اعتبارهما من أهم الأجزاء التي تتأثر بالتغيرات الحرارية ، الكيميائية ، الميكانيكية والإجهاد الازموزي (18، 8).

يعد السائل الحويصلي من المحاليل البايلوجية المهمة كونه غني بالهرمونات الستيرويدية كالتستوستيرون ، الاستروجين والبروجستيرون (3) بالإضافة الى العناصر الغذائية وعوامل النمو والتي يمكن أن تؤثر ايجابيا على حيوية الحيامن بعد الإذابة (2).

تعد الحركة الفردية والحركة التقدمية للحيامن أهم المؤشرات الأساسية لتقييم القابلية الاخصابية للحيامن و كما إنها تعتمد بشكل واسع كمؤشر مهم للكفاءة الوظيفية والتركيبية للحيمن بالإضافة إلى إنها تعبر عن الفعالية الايضية للحيامن (1) .

وقد جاءت هذه الدراسة لمعرفة إمكانية تحسين مواصفات السائل المنوي المجمد للكباش لإغراض التلقيح الاصطناعي والإخصاب الخارجي عن طريق إضافة نسب مختلفة من السائل الحويصلي للأغنام إلى وسط التنشيط التقليدي ضمن تقانة السباحة إلى الأعلى (Swim up technique).

المواد وطرائق العمل:

جمع المبايض:

تم جمع مبايض الاغنام من مجزرة السماوة بعد الذبح مباشرة ووضعت في حاويات بلاستيكية حاوية على المحلول الفسيولوجي (Normal saline 0.9% NaCl) مضاف اليه المضادات الحيوية (100IU/ml Penicillin وstreptomycin 100µg/ml) ونقلت الى المختبر بواسطة قنينة ثرموس تحت درجة 30-35°م خلال وقت قصير (1 ساعة)، وفي المختبر تم غسل المبايض باستخدام المحلول الفسيولوجي الدافئ (37°م) ثلاث مرات للتخلص من بقايا الدم وتجنب التلوث حسب طريقة Rezk (15).

تحضير السائل الحويصلي واضافته الى الوسط الزرعي

تم سحب السائل الحويصلي من الحويصلات المبيضية المتواجدة على سطح مبايض الأغنام باستخدام ابرة قياس 5 مل ومحقنة طبية قياس 20 mm وحسب طريقة Kruip وDieleman (10) .

وقد تم ترشيحه باستخدام فلتر مليبور قياس 22mm وتم وضعه في أنابيب اختبار داخل حمام مائي بدرجة 45°م لمدة 45 دقيقة لإجراء عملية التعطيل Inactivation وذلك لتقليل فعالية بعض

البروتينات التي توجد في السائل الحويصلي والتي تعيق أو تبطئ من فعاليته (13) وبعدها تم وضع السائل الحويصلي داخل جهاز الطرد المركزي بقوة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة وذلك لإزالة الترسبات والمواد العالقة المتبقية في السائل الحويصلي ومن ثم تم سحب السائل الحويصلي المنقى وإضافة المضادات الحيوية (البنسلين والستربتومايسين) إليه وتجميده لحين استخدامه وذلك بإضافته إلى الوسط الزرعي المستخدم للتنشيط وحسب النسب المذكورة آنفاً (0 ،5، 10 و15%).

إذابة وتنشيط الحيامن :

تم إخراج قصبات السائل المنوي المجمد من قنينة النيتروجين السائل ووضعت مباشرة في حمام مائي بدرجة 30 °م ولمدة 30 ثانية (1) بعد ذلك تم إخراج القصبات وقطع طرفيها بالمقص وتم استبعاد القطرة الأولى ووضع القطرة الثانية على شريحة زجاجية بدرجة 37 °م وتم إجراء التقييم الأولي للسائل المنوي تحت المجهر ، بعدها تم تقسيم السائل المنوي المذاب على قسمين رئيسيين ، وكل قسم رئيسي تم توزيعه على أربعة أنابيب اختبار من نوع ابندروف وتمت إضافة السائل الحويصلي الخاص بالأغنام مباشرة إلى عينات القسم الأول (بعد استخلاصه وإجراء عملية التعطيل عليه وإضافة المضادات الحيوية له) وبالتراكيز التالية (0 ،5، 10 و15%). وتم تسجيل قراءات الحركة الفردية والحركة التقدمية للحيامن فيه لكل تركيز على حدة ولعدة مرات لغرض معرفة تأثير السائل الحويصلي في تحسين الصفات المدروسة (بدون تنشيط) ، أما القسم الثاني من السائل المنوي فقد تم توزيعه على أربعة أنابيب ابندروف وإجراء التنشيط لها بطريقة السباحة نحو الأعلى وذلك بوضع الأنابيب الحاوية على المخفف والحيامن في جهاز الطرد المركزي بسرعة 700 دورة بالدقيقة لمدة 7 دقائق فتنفصل النطف في الأسفل على شكل راسب بعدها تم التخلص من الطبقة العلوية السائلة بهدوء وباستخدام ماصة Micropipette ثم وضع 1 مل من الوسط الزرعيSMART medium الحاوي على السائل الحويصلي بالتراكيز (0 ،5، 10 و15%) فوق النطف ووضعها في الحاضنة 37م° لمدة لأتقل عن 30 دقيقة بزاوية 45 بعدها تم سحب عينات من الطبقة العلوية وفحصها تحت المجهر الضوئي لتقييم الحركة الفردية والحركة التقدمية للنطف وتسجيل النتائج (5).

التحليل الإحصائي:

حللت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز (SPSS) 16) لمعرفة تأثير السائل الحويصلي و تقانة التنشيط في الحركة الفردية و الحركة التقدمية للنطف وفق تحليل التباين ذي التجارب العاملية بالاعتماد على الأنموذج الرياضي التالي

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}:$$

إذ أن:

Y_{ij}: قيمة المشاهدة العائدة لتأثير العاملين i و j

μ: المتوسط العام للصفة

A_i: تأثير السائل الحويصلي

B_j: تأثير تقانة التنشيط

AB_{ij}: تأثير التداخل بين السائل الحويصلي وتقانة التنشيط.

e_{ij}: تأثير الخطأ العشوائي الذي يتوزع توزيعا طبيعيا بمستوى صفر وتباين قدره $\delta^2 e$.

وقورنت متوسطات كل صفة حسب اختبار دنكن متعدد الحدود (4).

النتائج والمناقشة :

1- تأثير التنشيط وتركيز السائل الحويصلي في الحركة الفردية لحيامن الكباش المجمدة بعد الاذابة.

اظهـرت نتـائج الدراسـة وجـود تـاثير معنـوي ($P<0.05$) لعمليـة التنشـيط باسـتخدام الوسـط الزرعـي SMART medium (بـدون سـائل حويصلي) في الحركة الفردية للحيامن ، وقد ازداد تاثير عملية التنشيط معنويا ($P<0.05$) في الحركة الفرديـة للنطـف عنـد اضـافة السـائل الحويصـلي المعامـل بتركيـز 5% الـى الوسـط الزرعـي SMART medium ، وكـان التـاثير عـالي المعنويـة ($P<0.01$) عنـد اضـافة التركيـزين 10 و15% من السائل الحويصلي المعامل الى الوسط الزرعـي المسـتخدم لعمليـة التنشـيط المختبـري للحيامن بعد الإذابة

عنـد اجـراء المقارنـة بـين تـاثير تراكيـز السـائل الحويصـلي المعامـل (0 ،5، 10 ،15%) فـي الحركة الفردية للحيامن المنشطة اظهر التركيزين 10 و15% تفوقا عـالي المعنوية ($P<0.01$) علـى بقية التراكيز (جدول 1).

جدول رقم (1) يبين تأثيرالتنشيط وتركيز السائل الحويصلي في الحركة الفردية لحيامن الكباش المجمدة بعد الإذابة (المتوسط±الخطأ القياسي)

تركيز السائل الحويصلي %	الحركة الفردية للحيامن قبل التنشيط %	الحركة الفردية للحيامن بعد إلتنشيط %	مستوى المعنوية
0	0.06 ± 8.33 Bbc	0.12 ±15.00Ac	*
5	0.03± 5.00Bc	0.09 ±11.67Ac	*
10	0.07 ±10.00Bb	0.27±30.00 A	**
15	0.19±28.33 Ba	0.32± 41.67A a	**
مستوى المعنوية	**	**	

ملاحظة: الحروف الكبيرة المختلفة ضمن الصف الواحد تعني وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمال 0.01 و0.05 والحروف الصغيرة المختلفة ضمن العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمالية 0.01 .

2- تأثير التنشيط وتركيز السائل الحويصلي في الحركة التقدمية لحيامن الكباش المجمدة بعد الاذابة.

تأثرت الحركة التقدمية للحيامن معنويا ($P<0.05$) بعمليـة التنشـيط باسـتخدام الوسـط الزرعـي SMART medium (بـدون اضـافة السـائل

الحويصــلي) مقارنــة بهــا قبــل التنشــيط وكانــت (5.00±0.04، 6.67±0.05) قبــل وبعــد التنشــيط على التوالي ، ولكنها انخفضت معنويا (P<0.05) لـدى الحيـامن المنشـطة باسـتخدام الوسـط الزرعـي المـذكور مضـاف اليـة السـائل الحويصـلي المعامـل بتركيــز 5%، فيمــا كــان تــاثير اضــافة الســائل الحويصــلي الــى الوسـط الزرعـي المعـد للتنشـيط بـالتركيزين 10 و15% عاليـا المعنويـا (P<0.01) فـــي الحركـــة التقدميـــة للحيـــامن وكانـــت (13.33±0.07، 31.67±0.23) للتركيــزين المذكورين على التوالي.

وعنــد المقارنــة بــين االتراكيــز الاربعــة للســائل الحويصــلي (0 ،5، 10 ،15%) تفـوق التركيـزين الأعلــى (10 ، و15%) تفوقــا عــالي المعنويــة (P<0.01) علـى بقيـة التراكيـز فـي التـأثير علـى الحركة التقدمية للحيامن بعد التنشيط (جدول 2).

جدول رقم (2) يبين تأثير التنشيط وتركيز السائل الحويصلي في الحركة التقدمية لحيامن الكباش المجمدة بعد الإذابة (المتوسط±الخطأ القياسي)

تركيز السائل الحويصلي%	الحركة التقدمية للحيامن قبل التنشيط %	الحركة التقدمية للحيامن بعد التنشيط %	مستوى المعنوية
0	0.04±5.00 B b	0.05±6.67 A c	*
5	0.03±6.67 Ab	0.04±5.00 B c	*
10	0.04±6.67 B b	0.07±13.33 A b	**
15	0.11±23.33 B a	0.23±31.67 A a	**
مستوى المعنوية	**	*	

ملاحظة: الحروف الكبيرة المختلفة ضمن الصف الواحد تعني وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمال 0.01 و0.05 والحروف الصغيرة المختلفة ضمن العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمالية 0.01 و0.05.

من خلال نتائج الدراسة الحالية يمكن التوصل الى حصول تاثير ايجابي لعملية تنشيط حيامن الكباش العواسية المجمدة بعد الاذابة وقبل اجراء التلقيح الاصطناعي وان هذا التاثير الايجابي يكون اكثر فاعلية عند اضافة السائل الحويصلي المعامل مختبريا الى الوسط الزرعي المستخدم في عملية التنشيط المختبري للحيامن ويكون التاثير عالي المعنوية عند اضافة التراكيز 10 و15 % من السائل الحويصلي باستخدام تقانة السباحة نحو الأعلى (Swim up) .

وهذا التاثير يمكن اعتباره تاثير ايجابي نحو تحسن نوعية السائل المنوي المجمد للكباش بعد الاذابة

لكون السائل الحويصلي يحتوي على مجموعة من العناصر الغذائية والستيرويدات وله تاثير وظيفي على الحيامن من خلال زيادة نفاذية غشاء الحيمن لهذه المواد وخصوصا الكولستيرول (7). من جهة اخرى اكد (2) على ان للسائل الحويصلي تاثير ايجابي على سلامة الكروماتين وتحسين نوعية السائل المنوي لاحتواء السائل الحويصلي على مجموعة من مضادات الاكسدة مثل (glutathione , peroxidase and superoxide dismutase) والتي تؤدي دورا فاعلا في تثبيط تحطم الحيمن وزيادة فعاليته.

References:

1. Bacinoglu, S and A.K. Kemal. 2007.The effect of thawing time, post thawed thermal application and resistance test on semen characteristics in bulls. J.Fac.Vet.Med.Istanbul Univ.33(2):12-22.
2. Bahamanpour,S., S. Namavar, T. EL-Khozani, and Mazaheri, Z. 2012.The effect of the follicular fluid on sperm chromatin quality in comparison with conventional media. European Review for Medical and Pharmacological Sciences,16:1840-1846.
3. Bearden, H.J and W.J. Fuquay. 1997. Endocrine regulators of reproduction .ch4.Applied animal reproduction . 4th ed. New Jersey. prentice hall.USA.
4. Duncan's,B.D.1955.Multiple range and multiple f-test. Bioometrics,11:1-42.
5. DeSmedt, V; N. Crozed; M. Ahmed-Ali; A. Martino and Cogine, Y. 1992. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes.Theriogenology,37: 1049-1069.
6. Donovan, .A; J.P Hanrahan and Lally T. 2001. AI for sheep using frozen- thawed semen. project report. Faculty of Agriculture. University College Dublin Belfield, Dublin 4.UK.
7. Hamdi, S. M.; G. Vieitez; G. Jaspard and Barbaras,.R.2010. Effects of human lipoproteins on early spermatozoa hyper activation and cholesterol efflux. Journal of Lipid Research,51:1364-1369.
8. Hammerstedt, R.H; J.K. Graham and Nolan, J.P .1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. J. Androl., 11: 73–88.
9. Jones, R. C. 1973.Preparation of spermatozoa for electron and light microscopy. J. Reprod. Fertil., 33: 145–149.

Assessment of Cryopreserved Semen. Chapter.20: 547-574.INTECH. Wroclaw University of Environmental and Life Sciences. Poland.

15. Rezk, W. A. K. 2009. Studies on *invitro* fertilization in camels (*Camelus dromedaries*). Dissertation. Mansoura: Univ. Mansoura. Egypt.
16. SPSS.1999. Base 10.0 Users Guide.USA.SPSS.INC.
17. Watson, P. F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In ‘‘Effects of Low Temperatures on Biological Membranes’’ (C. F. Morris and A. Clarke, Ed.), Academic Press, London. England).
18. Watson, P. F. 1995.Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev.,7: 871–891.
10. Kruip, T. A. M. and S.J. Dieleman. 1982. Microscopic classification of bovine follicular fluid and validation by micrimorphological and steroid biochemical procedure. Reprod.Nutr.Dev.,22:465-473.
11. Ollero, M.; R. Perez-Pe; T. Muin˜o-Blanco and Cebrian-Perez, J. A. 1998. Improvement of Ram Sperm Cryopreservation Protocols Assessed by Sperm Quality Parameters and Heterogeneity Analysis Cryobiology, 37: 1–12.
12. Ortman, K. and H. Rodriguez-Martinez. 1994.Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. J. Vet. Med. A-Zbl Vet. A-Physiol., 41: 37–47.
13. Otte, S. V; J. P. Paletta; S. Becker; S. Ko¨nig; M. Fobker and Greb.R.2006. Follicular Fluid High Density lipoprotein associated Sphingosine 1-Phospate is a novel mediator of Ovarian Angiogenesis. The J. of Biol. Chem., 281(9):5398–5405.
14. Partyka, A., W. Niżański and Ochota. M. 2012. Methods of

Effect of Sperm Activation and Addition of Treated Sheep Follicular Fluid on the Quality of Awassi Cryopreserved Semen

Ali Abdullah Zuairi Al- Sadoon[1] Hazim Kassar Jaser AlSaab[2]

Eqbal Awad Gatea[1]

1-College of Agriculture / Department of Animal /University of Al- Muthanna Resources, Republic of Iraq

2 College of Agriculture / Department of Animal / University of Baghdad Resources, Republic of Iraq

Republic of Iraq

Abstract

This study was conducted at the laboratory of Higher study /Animal Resources Department /College of Agriculture /University of Al-Muthanna at the summer of 2015, to evaluate the effect of follicle fluid to improvement of fertilization ability (representing on individual motility and progressive motility) of ram sperms after cryopreservation- thawing . Twenty five cryo-semen straw for four Awassi rams were thawed gradually and evaluated initially for individual motility and progressive motility, than the semen was divided into two major part, part one was divided into four eppendrof tubes and extended with SMART medium treated with follicular fluid (FF) in concentrations with (0, 5, 10, 15%) , semen from this four treatment was evaluated for individual motility and progressive motility to understand the effect of FF on this characteristics'. Part two also divided into four eppendrof tubes and subjected into sperm activation using swim-up technique and extending with SMART medium treated with follicular fluid (FF) in concentrations with (0, 5,10,15%) and incubated under 37C˚ .After 45 minutes ,the four treatment was evaluated for individual motility and progressive motility to learning the effect of sperm activation with FF on improvement this characteristics as a model for semen quality . The results indicated that the activation was significantly ($P<0.05$) improve the individual motility(11.67 ± 0.09) after activation as compared with (5.00 ± 0.03) before activation , while the activation was highly significantly ($P<0.01$) improve the individual motility (30.00 ± 0.27 and 41.67 ± 0.32) and progressive motility (13.33 ± 0.07 and

31.67± 0.23) of ram sperms with highest concentration (10,15%) of FF. According the result of the present study , there was an ability to improve the quality of Awassi ram semen after cryopreservation –thawing by applying the sperm activation (swim-up technique) with SMART medium treated with (10,15%) of FF before Artificial Insemination.

Keywords: follicular fluid , Semen , Awassi ram